

Attorney Docket No.: 990360/LH

**IN THE UNITED STATES PATENT  
AND TRADEMARK OFFICE**

Applicant : Masataka KINJO

Serial Number : 09/325,189

Filed : 3 Jun 1999

Art Unit : 1643



**CERTIFICATE OF MAILING**

I hereby certify this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as First Class mail in an envelope addressed to: Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on the date noted below.

Attorney: Leonard Holtz

Dated: December 21, 1999

**RECEIVED**

**DEC 30 1999**

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Enclosed are Certified Copy(ies); priority is claimed under 35 USC 119:

| <u>Country</u> | <u>Application No.</u> | <u>Filing Date</u> |
|----------------|------------------------|--------------------|
| JAPAN          | 10-347493              | December 7 1998    |
| JAPAN          | 10-353254              | December 11 1998   |

Respectfully submitted,

Frishauf, Holtz, Goodman  
Langer & Chick, P.C.  
767 Third Avenue - 25th Fl.  
New York, N.Y. 10017-2023  
TEL: (212) 319-4900  
FAX: (212) 319-5101  
LH/pob

Leonard Holtz  
Reg.No. 22,974

GP 1643  
1/6/00



日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年12月7日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第347493号

出願人

Applicant (s):

金城 政孝

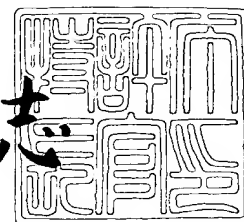
DEC 30 1999

DEC 30 1999

1999年6月4日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3035514

【書類名】 特許願

【整理番号】 A009807693

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成10年12月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 12/68  
C12N 15/09  
G01N 33/50

【発明の名称】 標的核酸の定量分析方法および装置

【請求項の数】 17

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北23条西13丁目南新川宿舎10 -  
404

【氏名】 金城 政孝

【特許出願人】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北23条西13丁目南新川宿舎10 -  
404

【氏名又は名称】 金城 政孝

【代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100100952

【弁理士】

【氏名又は名称】 風間 鉄也

【選任した代理人】

【識別番号】 100097559

【弁理士】

【氏名又は名称】 水野 浩司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 標的核酸の定量分析方法および装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プライマと基質分子と核酸合成酵素と標的核酸分子とを含む検液による核酸増幅反応を利用した標的核酸の分析方法であって、測定可能な信号を発生し得る標識分子で標識した基質分子を含む検液でもって核酸増幅反応を実行する工程と、核酸増幅させた検液について、上記標識分子からの信号を測定する工程と、測定した信号に基づいて上記標識分子の液中での動き易さを評価する工程と、評価結果に基づいて標的核酸分子を定量する工程とを有することを特徴とする標的核酸の分析方法。

【請求項 2】 測定工程は、所定の測定領域内の標識分子の存在量を測定する工程を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 測定工程は、所定時間内の移動量を複数回測定することを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 評価工程は、複数の測定データに基づいて移動量の変化を表現する統計学的データに変換する工程を含むことを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 変換する工程は、自己相関関数による演算を実行する工程を含むことを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 増幅反応を実行する工程と測定工程の間に、さらに核酸増幅反応に関与しなかった上記標識した基質分子を除去する工程を含み、測定工程を検液に非接触な状態で測定するようにしたことを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 定量工程が、評価結果に基づいて核酸増幅の間に取込まれた標識分子の有無を判断する工程を含むことを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 定量工程が、評価結果に基づいて核酸増幅の間に取込まれた標的核酸分子の個数を判断する工程を含むことを特徴とする請求項 1 から 5 のい

ずれかに記載の方法。

【請求項 9】 プライマと基質分子と核酸合成酵素と標的核酸分子とを含む検液による核酸増幅反応を利用した標的核酸の分析装置であって、測定可能な信号を発生し得る標識分子で標識した基質分子を含む検液を保持する保持手段と、保持された検液について、核酸増幅反応の後に標識分子からの信号を測定する測定手段と、測定した信号に基づいて上記標識分子の液中での動き易さを評価する評価手段と、評価結果に基づいて標的核酸分子を定量したデータを出力するデータ出力手段とを有することを特徴とする標的核酸の分析装置。

【請求項 10】 測定手段が、焦点付近の回折限定領域にもたらされる微小視野内での測定を実施する光学系を有することを特徴とする請求項 9 に記載の装置。

【請求項 11】 測定手段が、共焦点光学系により形成される微小視野内での測定を実施する顕微鏡を有することを特徴とする請求項 9 に記載の装置。

【請求項 12】 回折限定領域が、平均直径  $30 \pm 20 \mu\text{m}$  のアパーチャーにより形成されることを特徴とする請求項 10 または 11 に記載の装置。

【請求項 13】 回折限定領域が、平均直径  $20 \pm 10 \mu\text{m}$  のアパーチャーにより形成されることを特徴とする請求項 10 または 11 に記載の装置。

【請求項 14】 微小視野が、平均半径  $200 \pm 50 \text{ nm}$  および光軸上の平均長さ  $2000 \pm 500 \text{ nm}$  の略円柱状領域であることを特徴とする請求項 10 または 11 に記載の装置。

【請求項 15】 評価手段が、所定時間内に得られる複数の測定データを記憶する手段と、記憶した複数の測定データを自己相関関数で演算する演算手段とを有することを特徴とする請求項 9 に記載の装置。

【請求項 16】 評価手段が、測定領域内で得られる複数の標識分子に関する測定データを記憶する手段と、記憶した測定データを個々の標識分子毎に自己相関関数で演算する演算手段とを有することを特徴とする請求項 15 に記載の装置

【請求項 17】 データ出力手段が、自己相関関数で演算された結果に基づいて、複数の追跡データに関する時間的な位置変化を表現する統計学的データに変換する変換手段を含むことを特徴とする請求項 15 または 16 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中に存在する核酸分子を分析する技術に関し、特に、核酸増幅反応による反応結果に基づいて、標的核酸分子を検出するための分析方法および装置に関する。本発明は、単一の核酸分子に関する追跡データを有効に利用して増幅反応の有無および／または反応量を得るような検出方法に適用される。従って、本発明は、標的核酸分子の個数に関係した情報を得る任意の目的にも、有効に適用できる。

【0002】

【従来の技術】

DNA や RNA などの核酸の検出と分子量の測定は、生化学や分子生物学の研究において最も重要な分析手段である。また、最近では、遺伝子診断や遺伝子治療においても重要な分析手段となっている。例えば、遺伝子増幅法として非常に重要な PCR (ポリメラーゼ・チェーン・リアクション) 法においては、その増幅した遺伝子の最終的な検出は、ゲル電気泳動法を用い、鎖長 (分子量) 毎の分画に分離した後に、特定位置の分画の有無を測定している。

【0003】

核酸合成酵素としての DNA ポリメラーゼと、複製を開始するためのプライマと、複製時の基質としての四種類の塩基 (dATP、dGTP、dTTP、dCTP) の存在下で、標的核酸分子を、基質分子の重合反応が可能な条件で処理すると、標的核酸由来の一本鎖 DNA を鋳型 (template DNA) にして、相補鎖を合成して二本鎖 (dsDNA) を形成するような核酸増幅が起こることが知られている。

【0004】

PCR法において、増幅されたdsDNAの総量は、適宜の容器中またはプレート上の検液全体が放つ蛍光総量として蛍光計測計により測定される。こうして測定された蛍光総量は、十分に増幅された後の標的DNAに相当する。しかし、

PCRにおける増幅反応は、相反する温度条件下での反応過程、即ち、dsDNAを二本の分かれたssDNAに分離するように変性させるために高温下に試料を置く昇温段階と、ssDNAを上述した1対のプライマとハイブリダイズさせるために温度を下げる降温段階とを含んでいるので、増幅の様子を定量的に追跡することは困難である。従って、従来のPCR法では、標的核酸の増幅中または増幅前の総量を定量的に解析することは不可能であった。

【0005】

近年、標識分子の液体中のゆらぎ運動を測定し、自己相関関数 (Autocorrelation function) を用いて、個々の標的分子の微小運動を正確に測定する技術が登場した。この種の方法は、特に、標識分子としての蛍光分子を光学機器によって測定するので、相関蛍光分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy、略してFCS) と呼ばれている。FCSを用いた生物学的材料に関する測定データの演算手法は、標識された核酸プローブと標的核酸分子とのハイブリダイゼーション反応においてFCSを利用した報告 (Kinjo, M.、Rigler, R.、Nucleic Acids Research、23、1795-1799、1995) に開示されている。

【0006】

FCSを用いた標的遺伝子の検出は、最近いくつか報告されている。NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) がFCSと結合され、血清中のHIV (Human Immunodeficiency Virus) の診断に有効な検出法であることが分かった (Oehlenschlaeger, F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93、12811-12816、1996)。このNASBA法は、P



CRの変法であるが、T7RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、及びRNaseHと言う、3つの酵素の存在下で、2つのプライマと、プローブとして蛍光標識した別途のプライマとを必要とする。

【0007】

NASBA法よりも簡単な方法（FCSによる増幅プローブ伸長検出法、APEX（Amplified Probe Extension）が同じグループから報告されている（Walter, N. G. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93、12805-12810、1996）。それでも、順方向（forward）プライマと逆方向（reverse）プライマ・セットの他に、プローブとして蛍光標識した別途のプライマを必要とする。このAPEXの実験では、自己相関関数の時間的変移が26サイクル後に観測される。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記NASBA法およびAPEX法は、いずれも、通常の核酸増幅の材料とは別の標識されたプローブを必要とするので、反応条件が複雑となり、分析精度を安定に制御するのが困難である。また、標識分子は、1つの蛍光標識で標識されているので、標識分子で標識されたプローブのうち、ハイブリダイズしないプローブから出される標識由来の信号がS/N比を顕著に低下させるので、標的核酸分子の初期濃度が少ないほど、検出感度も低下しがちである。さらに、検出可能になるまでに、多くのPCRサイクルを回さなければならない。

【0009】

本発明は、かかる核酸検出方法の実態に鑑み、標的核酸分子の存在量を正確且つ簡単な構成で定量できる分析方法および装置を提供することを目的とする。また、本発明の別の目的は、少ないコピー数でも高感度で定量できるようにすることである。また、本発明の別の目的は、微量の試料でも標的核酸分子の有無を検出できるようにすることである。また、本発明の別の目的は、PCRにおける増幅過程を分子レベルで知ることができるようにすることである。

【0010】

【課題を解決するための手段および作用効果】

本発明は、蛍光分子で標識したヌクレオチドである f l u o r e s c e i n - 1 1 - d U T P を核酸含有試料と DNA ポリメラーゼとともに混合して、核酸増幅を実行したところ、増幅過程で取込まれた蛍光色素分子の運動状態が変化することを画像解析により立証できたという発見に基づくものである。また、本発明は、蛍光色素分子の運動状態を自己相関関数でもって評価したところ、定量性の有る結果が出せたという発見に基づくものである。さらに、本発明は、核酸増幅過程で標的核酸分子に取込まれなかった標識化基質分子をゲルろ過カラム等で分離することで、測定への問題も無く、一層の感度上昇が達成できたという発見に基づくものである。

【 0 0 1 1 】

即ち、本発明の標的核酸の分析方法は、プライマと基質分子と核酸合成酵素と標的核酸分子とを含む検液による核酸増幅反応を利用した標的核酸の分析方法であって、測定可能な信号を発生し得る標識分子で標識した基質分子を含む検液でもって核酸増幅反応を実行する工程と、核酸増幅させた検液について、上記標識分子からの信号を測定する工程と、測定した信号に基づいて上記標識分子の液中での動き易さを評価する工程と、評価結果に基づいて標的核酸分子を定量する工程とを有することを特徴とするものである。

【 0 0 1 2 】

ここで、測定工程は、所定の測定領域内の標識分子の存在量を測定する工程を含むのが好ましい。さらに、この測定工程は、所定時間内の移動量を複数回測定するのが好ましい。また、増幅反応を実行する工程と測定工程の間に、さらに核酸増幅反応に関与しなかった上記標識した基質分子を除去する工程を含み、測定工程を検液に非接触な状態で測定するようにすれば、感度上昇を容易に得られる上に、非接触な測定なので、測定精度を低下させず、再現性の良い結果を維持できる点で好ましい。

【 0 0 1 3 】

また、評価工程は、複数の測定データに基づいて移動量の変化を表現する統計

学的データに変換する工程を含むのが好ましい。さらに、この変換する工程は、自己相関関数による演算を実行する工程を含むのが好ましい。また、定量工程は、評価結果に基づいて核酸増幅の間に取込まれた標識分子の有無を判断する工程を含むのが好ましい。また、定量工程は、評価結果に基づいて核酸増幅の間に取込まれた標的核酸分子の個数を判断する工程を含むのが好ましい。

【0014】

また、本発明の標的核酸の分析装置は、プライマと基質分子と核酸合成酵素（＝ポリメラーゼまたは逆転写酵素）と標的核酸分子とを含む検液による核酸増幅反応を利用した標的核酸の分析装置であって、測定可能な信号を発生し得る標識分子で標識した基質分子を含む検液を保持する保持手段と、保持された検液について、核酸増幅反応の後に標識分子からの信号を測定する測定手段と、測定した信号に基づいて上記標識分子の液中での動き易さを評価する評価手段と、評価結果に基づいて標的核酸分子を定量したデータを出力するデータ出力手段とを有することを特徴とするものである。

【0015】

ここで、測定手段は、焦点付近の回折限定領域にもたらされる微小視野内での測定を実施する光学系を有するのが好ましい。或いは、測定手段は、共焦点光学系により形成される微小視野内での測定を実施する顕微鏡を有するのが好ましい。さらに、回折限定領域は、平均直径  $30 \pm 20 \mu\text{m}$  のアパーチャーにより形成されるのが好ましい。また、回折限定領域は、平均直径  $20 \pm 10 \mu\text{m}$  のアパーチャーにより形成されるのが好ましい。

【0016】

また、微小視野は、平均半径  $200 \pm 50 \text{ nm}$  および光軸上の平均長さ  $2000 \pm 500 \text{ nm}$  の略円柱状領域であるのが好ましい。

【0017】

また、評価手段は、所定時間内に得られる複数の測定データを記憶する手段と、記憶した複数の測定データを自己相関関数で演算する演算手段とを有するのが好ましい。さらに、この評価手段は、所定の測定領域内で得られる複数の標識分子に関する測定データを記憶する手段と、記憶した測定データを個々の標識分子

毎に自己相関関数で演算する演算手段とを有するのが好ましい。

【0018】

また、データ出力手段は、自己相関関数で演算された結果に基づいて、複数の追跡データに関する時間的な位置変化を表現する統計学的データに変換する変換手段を含むのが好ましい。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明においては、PCR法における核酸増幅過程に取込まれる基質分子の少なくとも1種類が測定可能な信号を発生し得る標識分子で標識されている。このような標識分子を有する基質分子は、標的核酸と合成開始用のプライマとの核酸ハイブリダイゼーションの反応工程中では、結合することなく、遊離の状態である。ハイブリダイゼーション反応に続く核酸合成反応において、標的核酸分子に結合したプライマに核酸合成酵素が働きかけると、プライマが伸長しようとして合成に必要な基質分子を次々に取込む。こうして核酸増幅中に基質分子と一緒に取込まれた標識分子は、遊離の標識分子に比べて液体中で動き易さが減少する。

【0020】

従って、有効回数のPCRサイクルを経た試料含有の検液の少なくとも一部を、定量的に分取されるか容器その他に保持されたまま、標識分子の測定に附される。ここで、検液の保持手段は、試験管、ウェル、シャーレ等の凹状の容器でも、スライドガラス等の平坦な板状支持体でもよい。場合によっては、測定手段の表面に直接的に点着させて保持するようにしてもよい。

【0021】

測定手法は、増幅に伴う標識分子の大きさ変化に関する測定を行うものであれば、適宜選択してよく、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、蛍光計測用フローサイトメータ、イメージサイトメータ、蛍光顕微鏡等が有効に利用できる。測定工程が、3次元の微小視野内において実行されることにより、標的分子の試料含有液の中における自由な微小運動を、PCR反応の結果に応じた自然状態のままで高精度に測定できる。これに対して、2次元的な視野内で測定すると、ブラ

ウン運動のように、標識分子の3次元的に自由な移動をもれなく捕らえることができないので、測定精度が低い。微小視野を形成するに当たっては、ハロゲンランプからの光を収束させたり極微小の平均半径からなるアパーチャー（ピンホール、光ファイバ端面等）から出射するように光学設計することによって得ることもできるが、レーザ光線による収束光を利用するのが好ましい。

【0022】

測定工程の微小視野が、共焦点光学系により形成されることにより、被写界深度の深い測定データが得られるので、個々の任意の標識分子が視野内で常に合焦して正確な位置および出力データを測定手段に供給することができる。

【0023】

微小視野が、焦点付近の回折限定領域であることにより、個々の標識分子を高いS/N比で測定できる。

【0024】

回折限定が平均直径 $15 \pm 5 \mu\text{m}$ のピンホールにより形成されることにより、少数の選ばれた標識分子からの測定データを効率良く得ることができる。

【0025】

微小領域が平均半径 $200 \pm 50 \text{ nm}$ および光軸上の平均長さ $2000 \pm 500 \text{ nm}$ の略円柱状領域であることにより、測定視野内に照準された標識分子に関する自由な微小運動を効率良く取得することができる。

【0026】

本発明では、微小の測定視野内を出入りする標識分子の運動速度を、所定空間内において1以上の個々の標識分子から測定される出力強度の増減または消出を指標として測定している。従って、基質分子を標識する標識分子の種類は、複数の測定時点において、ほぼ一定の出力を維持するような標識材料であるのが好ましい。このような標識分子の材料としては、発光性物質、蛍光性物質、磁性物質、放射性物質その他が挙げられる。特に、発光性物質と蛍光物質は、長時間、発光または蛍光を発するような色素を選ぶのが好ましい。標識分子として、発光色素や蛍光色素を有するものを使用すれば、光学的に容易な構成で分子レベルの測定を実行できる。蛍光色素としては、DAPI、FITC、ローダミン、Cy3

、CY3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7等種々公知のものが挙げられる。

【0027】

測定工程が、蛍光分子の液中での動き易さを測定する場合には、フォトマルチプライヤやフォトダイオード等の蛍光測定手段により蛍光データを受光することができる。蛍光測定手段は、単一フォトンを計測し得るような測定モードを備えている方が、蛍光分子に関する個別の測定を行うのに有利である。

【0028】

測定工程が、標識分子の液体中のゆらぎ運動を測定するものである場合には、本発明を更に有効な実施形態とすることができ、個々の標的分子の微小運動を正確に測定することができる。ゆらぎ運動の測定を行うに当っては、自己相関関数 (Autocorrelation function) を用いて演算するのが好ましい。特に、標識分子として、蛍光を用いる場合には、自己相関蛍光分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy、略してFCS) を採用するのが好ましい。FCSを用いた生物学的材料に関する測定データの演算手法は、標識された核酸プローブと標的核酸分子とのハイブリダイゼーション反応においてFCSを利用した報告 (Kinjo, M.、Rigler, R.、Nucleic Acids Research、23、1795-1799、1995) を参照することができる。

【0029】

FCSを実施する装置の概略は、図1に示す。このFCS装置は、共焦点光学系を用いた倒立型の蛍光顕微鏡1と試料からの蛍光を測定するためのフォトマルチプライヤ2と測定データを受信して自己相関関数による演算を行って数値化またはグラフ化を行うデータ処理装置3と、演算結果を画面上に表示する表示装置4とを備えている。

【0030】

試料含有液11は、図1に示す通り、試料台12に載せたスライドガラス13上に点着させることで、簡単にセットできる。この装置では、特に、微量の試料含有液11を用いるため、水分の蒸発を防止するための蓋14をスライドガラス13上にかぶせてある。この蓋14は、好ましくは、光透過性になるべく低い

ものを用いることで、気密性と遮光性を同時に得られる。但し、蓋の内面は、励起光線の反射を防止するように、できるだけ光反射性の低いものを使用するのが好ましい。試料含有液11が位置するスライドガラス13部分の真下には、試料含有液11中で焦点を結ぶように設定した対物レンズ15が配置している。

【0031】

なお、蛍光顕微鏡1は、落射型でもよい。落射型においては、対物レンズ15のレンズ下面に直接的に試料含有液11を点着してもよい。また、蛍光顕微鏡1の光源であるレーザ発生装置16は、図1ではアルゴン(Ar)イオンレーザーを使用しているが、蛍光の種類に応じて、クリプトンアルゴン(Kr-Ar)イオンレーザー、ヘリウムネオン(He-Ne)レーザー、ヘリウムカドニウム(He-Cd)レーザー等に種々変更して構わない。また、蛍光顕微鏡1におけるスライドガラス13の搬入や搬出、スライドガラス13等への試料含有液の点着、蓋14の開閉等の各種動作は、必要に応じて適宜自動化してもよい。

【0032】

図2は、図1の蛍光顕微鏡1の測定部分を示す拡大図である。図2(A)において、スライドガラス13と所定の開口数(図では $FA=1.2$ )の対物レンズ15との位置関係により、微小視野領域20が形成される。この微小視野領域20は、図2(B)に示すように、実際には、ボリュームを持ったレーザ光線の焦点(図では中間のくびれた部分)から上下に伸びた略円柱状の視野を有している。この視野領域20は、焦点を基準位置として、光軸上の長さZと平均半径Wにより規定される。このような、微小領域20における蛍光測定は、蛍光分子の微小運動を追跡し得る最小限の領域にまで小さくすることにより、試料含有液11中の焦点付近以外の蛍光分子に由来するノイズを有効に除去し、1個ずつの蛍光分子を正確に測定するのに寄与している。

【0033】

本発明は、上述した種々の実施の形態に基づき、遺伝病診断、親子鑑定、犯罪調査、遺伝子治療、分子生物学的研究、医薬品開発等に応用可能である。上述した実施の形態についても、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、変更可能な発明を包含する。例えば、上述した実施の形態では、測定装置として、蛍光顕微

鏡の試料台にて、顕微鏡観察時と同じ環境下で測定可能なものを説明したが、欧州公開特許第640828A1号に開示している装置を改良し、サーマルサイクラーの内部の試料含有液に対して、対物レンズから出射するレーザ光をフォーカシング可能となるように光学的に設計すれば、試料含有液をスライドガラス上に移すことなく、増幅反応を連続的に測定できる。また、PCRサイクルにおける経過時間内の複数データの取り方は、所定サイクル後の一定時間内に継続的または断続的に複数得る場合と、異なるサイクル毎に適当数の測定データを得る場合の何れもあり得る。

【0034】

以下に、本発明の実施例を説明するが、本発明はこれら実施例に限定されることなく、発明の主旨に基づいて、本発明の出願時の技術水準に応じて自明な範囲における種々の変更が可能である。

【0035】

【実施例】

(1) 蛍光標識したヌクレオシド存在下でのPCR

0.1  $\mu$ l<sup>-1</sup> Pol I 型DNA合成酵素 (Ampli Taq Gold、Perkin-Elmer)、1XバッファーI (Perkin-Elmer)、200  $\mu$ MのdATP、dGTPおよびdCTP、120  $\mu$ MのdTTP、80  $\mu$ Mのフルオレッセイン11-dUTP (FluoroGreen、Amersham Fluor-dUTP)、及び0.8  $\mu$ Mの順方向 (forward) と逆方向 (reverse) の各プライマを含んだ混合溶液を検液とし、この検液を5  $\mu$ lと25  $\mu$ lで、標準的な核酸増幅を行った。

【0036】

鋳型として200 pg/5  $\mu$ lの全長ラムダファージDNA (48.5 kb) を用いた。標的DNAの長さは、4000 bpであった。核酸増幅に用いたプライマの塩基配列は、順方向プライマがGATGAGTTCGTGTCCGTACAACT (塩基番号=7131-7153)、逆方向プライマがCTTAACCAAGTGCGCTGAGTGACT (塩基番号=11098-11120) であった。



【0037】

核酸増幅反応を行うためのPCR装置は、プログラマブルなサーマル制御システム（PC700、Astec社）を用い、上記各検液を収容するPCR用容器としてオイルフリー反応管（宝酒造）を用いた。即ち、先ず96℃で15分間の変成処理（初期変成処理）を行った後に、55℃で15分間のインキュベーションによるアニール処理と、65℃で4分間のインキュベーションによる伸長反応と、さらに96℃で1.5分間のインキュベーションによる変成処理から成る各回のPCRサイクルを実行した。PCR用容器は、予め決めたPCRサイクルで取り出し、次の処理まで-20℃に保存した。

【0038】

組み込まれなかったヌクレオシドを取り除く為に、PCR反応させた各検液の混合液が50 $\mu$ lになるように蒸留水を加えたものをMicroSpinカラム（S-400HR、Pharmacia Biotech社）にかけた。このカラムでもって収集した各溶液の体積V<sub>c</sub>を重量で測定したところ、55 $\mu$ lから60 $\mu$ lの間に分布していた。溶液は更に精製することなく、次のFCS測定を行った。1つの塩基対の分子量は660Daと仮定した。従って、ラムダファージDNAの分子量は32 $\times 10^6$ Daと計算出来た。

【0039】

（2）FCS測定

図1に示したようなFCS装置を用いて、FCS測定を実行した。即ち、核酸増幅反応させた検液の一部を試料として、その試料液滴を試料スライド上に点着した状態で、市販のFCS装置（ConfoCor、Carl Zeiss Jena GmbH）の試料台に載せ、倍率40倍の対物レンズ（C-Apochromat、NA=1.2）により、レンズ内を通過してきたCW Ar<sup>+</sup>レーザービームで励起され、放出光はアバランシュ・ダイオード（APD）であるSPCM-200-PQ（EG&G社）でシングル・フォトン・カウンティング・モードで蛍光信号を測定する。測定した蛍光信号は、デジタル・コリレーターであるALV 5000/E（ALV GmbH）で解析することにより評価した。なお、測定用の試料液滴は、実際には、カバーガラス上に20 $\mu$ lを点着し、測定中の蒸発

を防ぐ為に、カバーガラスを覆うように小さな箱を試料台上にかぶせた。また、焦点領域の試料体積は、ローダミン6Gの拡散計数値から決定した。また、体積要素は、フルオレッセインとFluor-UTPの溶液の濃度を用いて定めた。

#### 【0040】

約1分間測定した蛍光信号は、逐次記憶部に記憶させるとともに、蛍光自己相関関数 $G(t)$ に適用させることにより解析されるようにプログラミングして、評価を行った。この蛍光自己相関関数 $G(t)$ は、測定領域内での蛍光分子の平均数 $N$ 、モノヌクレオシド(モノマーDNA)としての遊離の標識化基質分子(Fluor-UTP)の並進時間 $\tau_{mono}$ 及びポリマーDNAとしての取込まれた標識化基質分子の並進時間 $\tau_{poly}$ から、Riglerらの方法(Fluorescence Spectroscopy-New Methods and Applications, Springer, Berlin, 13-24, In J. R. Lakowicz (Ed.), 1992参照)に基づき、以下の式1によって計算した。

#### 【0041】

##### 【数1】

$$G(t) = 1 + \frac{1}{N} \left[ \left\{ \frac{1-y}{1 + \frac{t}{\tau_{mono}}} \sqrt{\frac{1}{1 + s^2 \cdot \frac{t}{\tau_{mono}}}} \right\} + \left\{ \frac{y}{1 + \frac{t}{\tau_{poly}}} \sqrt{\frac{1}{1 + s^2 \cdot \frac{t}{\tau_{poly}}}} \right\} \right]$$

#### 【0042】

数式1において、 $y$ はポリマーDNA成分の割合、 $\tau_{mono} = W_o^2 / 4 D_{mono}$ 、 $\tau_{poly} = W_o^2 / 4 D_{poly}$ 、 $S = W_o / Z_o$ (ここで、 $W_o$ は焦点付近の微小視野に形成される略円柱状の測定領域(図2(B)参照)の体積要素の径であり、 $2Z_o$ はその長さを意味する)、 $D_{mono}$ 及び $D_{poly}$ はそれぞれモノマーDNA及びポリマーDNAの並進拡散係数である。

#### 【0043】

データ解析は、さらに、データとモデル間の正規化平均二乗偏差を計算するために非線形最小二乗パラメータ法を用いて行った。所望のPCRサイクルを経て増幅された分子の総数 $T$ は、式2;  $T = (N/V_c) V_c$ により計算することで

、定量化データとして出力するようにした。ここで、 $V_o$ は体積要素、 $V_c$ はスピнкаラムによって収集された溶液の体積である。FCS計測中、平均蛍光強度も測定した。その強度は体積要素中で増幅されたDNAに取り込まれたフロロフォア（Flu-dUTP）の総数を反映している。平均蛍光強度の計測速度をDNA分子数 $N_y$ で割った値は、DNA分子の平均計測速度 $C/M$ として採用した。この値は、PCR産物の実効的な標識濃度として用いることができるものであった。

#### 【0044】

##### （3）測定領域の算定

測定領域の体積要素は、基準となる試料としての、ローダミン6G、フルオレッセイン（fluorescein）、及びFlu-dUTPの拡散時間の測定から定めた。フォーカシングされた付近に設けられた測定領域（図2（B）参照）における長さとの比率は、式1における $S$ の値から求められ、約5であった。また、体積要素 $V_o$ は、 $1 \times 10^{-15} \text{ l}$ と計算された。

#### 【0045】

##### （4）PCRによるFlu-11-dUTPの取込み

PCRにおける蛍光標識ヌクレオシドの作用効果を明らかにするために、Flu-dUTPの濃度を10%から50%まで変化させて調べてみた。図3は、アガロース電気泳動における増幅産物4 kbの特性を示す写真である。即ち、50サイクルの核酸増幅反応後の検液としてのPCR反応混合液 $3 \mu \text{ l}$ を7%アガロースゲルにかけた。ここで、図3（A）は、エチジウム・ブロマイド（ethidium bromide）染色前、図3（B）は、エチジウム染色後である。また、図中Mは、分子マーカー（HaeIII-digestedファイク174 DNA）を示す。また、図中、「0」、「10」、「20」、「30」、「40」および「50」は、Flu-dUTPとdUTP+dTTPの％比を示している。FNは、蛍光ヌクレオシド（組み込まれていないヌクレオシド）である。また、図3（A）におけるゲルから発する蛍光の測定にはオレンジ色光学フィルターY a 3を用い、図3（B）における測定には赤色フィルターR 1を用いた。

【0046】

図3 (A) によれば、50%のFluor-UTP存在下においても、4000bpの蛍光PCR産物を合成することが分かる。標識DNAの蛍光強度は、Fluor-UTPの濃度と共に増加した。増幅DNAの総生産量はエチジウム染色して示すことが出来るが、この実験では、図3 (B) に示すように、産物量はFluor-UTPがない場合と同じであることが示された。

【0047】

(5) PCRにおける蛍光強度と増幅産物量

図4は、PCRにおける、Fluor-UTPの%比の関数として得た、標識濃度と産物量の関係を示すグラフである。図中、四角印は、DNA1分子当たりの平均計測値C/Mを示す。また、黒丸印は、観察視野である測定領域におけるDNA分子数を示す。図4によると、分子当たりの蛍光強度C/MがFluor-UTPの増加に連れて増加していることが分かった。この結果は、標識濃度はFluor-UTPの濃度に依存する、ことを示した。かつまた、DNA分子の数は、実験したFluor-UTPの濃度範囲内ではほとんど一定であった。この結果は、図3に示したゲル電気泳動の解析と一致した。これは、フルオレッセインがDNA合成酵素の働きを妨げない、ことを示している。モノマーとしての遊離のFluor-UTPとPCR産物の各C/M値を比較すると、4000bpのDNA鎖の中に取込まれたFluor-UTPモノマーの数が分かる。それは修飾されたヌクレオシドが隣同士に存在している可能性を示している。

【0048】

(6) FCSによるPCRのモニター

図5は、PCR反応の過程における自己相関関数の推移を示すグラフであり、相関曲線の典型的な時間変化を示している。図中、丸印は10サイクル、三角印は20サイクル、逆三角印は30サイクル、菱形印は40サイクル、四角印は50サイクルの核酸増幅反応をそれぞれ終了したときに、測定したものである。図5から分かるように、自己相関関数のゼロ時間遅れの値(y切片)はPCRサイクルと共に減少している。この結果は、DNA分子数の増加に起因している。

【0049】

図6は、各自己相関関数をゼロ時間遅れのところで規格化したグラフである。図6では、比較の為にFluor-UTPの曲線が、黒丸印で示されている。また、図中、実線は10サイクル、破線は20サイクル、点線は30サイクル、1点鎖線は40サイクル、2点鎖線は50サイクルの核酸増幅をそれぞれ終えたときの値である。図6から分かるように、10サイクル後に得られた自己相関関数（実線部分）は、Fluor-UTPのそれとは明らかな違いがある。この自己相関関数は、簡単な1成分モデルに当てはめることは出来なかったが、上記の式1に示したような2成分モデルに当てはめることが出来た。また、50サイクルのPCRを実行した検液においてさえ、短い拡散時間成分が検出出来た。短い成分はスピンカラムを通り抜けた未反応Fluor-UTPとして定義される。

【0050】

図7は、PCRサイクル数の関数としてPCR反応溶液中（ $5\mu\text{l}$ ）における増幅DNA分子数を示すグラフである。増幅されたDNA分子の総数を、上記の式2によって計算した。実験上、ラムダファージDNAの初期量を各種検討した。図中、四角印は $200\text{pg}$ （ $3.75 \times 10^6$ コピー）のラムダファージDNAを初期量とした場合を示し、以下、丸印は $20\text{pg}$ （ $3.75 \times 10^5$ コピー）、三角印は $2\text{pg}$ （ $3.75 \times 10^4$ コピー）、逆三角印は $0.2\text{pg}$ （ $3.75 \times 10^3$ コピー）をそれぞれ示す。

【0051】

図8は、鋳型の初期数の関数としての20サイクル後のDNA分子数を示したグラフである。DNAがPCRによって増幅された場合には、DNA分子数はプラトー効果に達する前に指数関数的に増加する。鋳型分子の初期数は、10サイクル後に $1024 (= 2^{10})$ 倍に増幅され得るので、 $3.75 \times 10^6$ コピー（ $200\text{pg}$ 相当）のDNAは $3.75 \times 10^9$ コピーという結果となる。しかしながら、初期コピー数が $3.75 \times 10^6$ の時、FCS計測で10サイクル後に $7.44 \times 10^9$ コピー計測され、同様に、初期コピー数が $3.75 \times 10^5$ の時には10サイクル後に $0.31 \times 10^9$ コピー計測された。このように、FCS計測の定量性は、増幅サンプルの早期段階では忠実度が低いように見える。これ

は、検出領域において増幅DNAが少なく、多くの取込まれていない標識ヌクレオシドが分布している結果といえる。

【0052】

FCSを用いたこの直接標識ベースのPCR定量は10サイクルの増幅後でも、 $10^3$ レベルの標的DNA初期濃度の検出が可能であるが、図8から分かるように、標的DNAの初期濃度が20サイクル後の方がより良く推定出来る。この図ではDNA分子の初期数と産物の数の関係は直線的であるので、FCS計測により目的DNA分子数の定量が可能である。また、データは省略するが、別の曲線を用いて同様の関係が500bpの別のDNA配列で検出出来ることも確認できた。さらに、種々の実験では、PCR20サイクル、 $5\mu\text{l}$ の試料溶液が用いられた。試料溶液量を増加すれば、もっと精密で且つ高い再現性を得る事が出来ることはいうまでもない。このことは診断応用においては最も重要なことである。それ故、時間や資源を節約するためには、良好な再現性を提供出来るようなサイクル数を実験を通じて適宜選択するのが好ましい。

【0053】

上述した実験結果に示すように、本発明では、直接標識PCRに対する分子計数方法としてFCSを用いることに初めて成功した。また、4000bpの標的核酸に対しても、50%のdTTPをFlu-dUTPに置き換えてもPCRが阻害されないことを証明した。例えば500bp、1000bp、2000bpといったもっと短い標的核酸に対しては、より強い蛍光バンドが50熱サイクル後のゲル電気泳動で検出された。この方法は、標識試薬として通常のPCRに用いられる基質分子に蛍光等の測定可能な標識分子に結合させたものを用いるので、他の通常のPCRの工程と同様に、通常の研究室で容易に応用出来る。ここで述べたFCSアッセイは、PCR条件のほんの少しの変更と、 $5\mu\text{l}$ 程の少量の検液としての反応溶液と、少数回のPCRサイクルが必要なだけである。DNA分子に取込まれた蛍光標識分子は、どの様な遺伝子マーカーや、感染マーカーにも結合させることが出来、既に確立されたPCR法のノウハウを有効に利用しながら、各種様々な生物の核酸分子を増幅出来る。

【0054】

本発明による FCS ベースの定量的 PCR は、多くの分野で有利である。というのは、このテクニックは高感度であり、時間や労力を節約し、そして反応成分の構成とその使用手順が極めて簡単であるからである。また、FCS の測定は非侵襲的であり、FCS で測定した検液を、更に次の実験、例えば蛍光ハイブリダイゼーションや FISH 解析にも都合よく使用することが出来ることも述べておきたい。さらに、FCS は、均一溶液中の制限酵素消化過程を測定する事もできる。それゆえ、ここで紹介したように、高密度に標識した DNA を用いることによって、点突然変異や RELF といった分析が、カラムクロマトグラフィーやゲルクロマトグラフィーのような分離方法を何ら用いることなく、増幅後引き続き FCS で検出出来るのである。これらの FCS ベースの PCR 定量法は診断やスクリーニング実験に応用され、さらには 1 分子検出ベースの新しい分野を開くものである。

【0055】

以上のように、FCS により生物科学における 2 つの重要なパラメーターを得ることが出来る。それは検出領域 ( $10^{-15}$  l) における分子の平均数と分子の並進拡散係数である。本発明では、FCS を 1 分子計測の道具として用いて PCR 産物の解析を行った。PCR による DNA の増幅過程がプラトーに達する前に、特定の DNA 塩基配列の定量を行う事が出来る。PCR に FCS を応用出来るようにする為に、酵素的増幅サイクルに用いる基質としてフルオレッセイン 11-d UTP を用い、かかる標識したヌクレオシド存在下で PCR を行うことによって、4000 bp のひょう標的 DNA のラベリングを行うことが出来た。10 サイクル後には、FCS 検出領域における蛍光性分子の拡散時間の増加によって増幅 DNA の検出が出来た。PCR 検出の微少な検出領域の体積 ( $5 \mu$  l) 中の標的 DNA の初期分子数は、 $3.75 \times 10^6$  コピーから  $3.75 \times 10^3$  コピーの範囲であった。

【0056】

蛍光エネルギー転移解析のような蛍光クエンチングに基づいた PCR 定量法が以前に報告されている (Heid, C. A. ら、Genome Res.、6、9

86-994、1996、Livak, K. J.、PCR Method App 1.、4、357-362、1995)。この技法は市販されているが、第1、第2のPCRプライマ・ペアーの他に、従来技術として述べたNASBA法とかAPEX法と同じく、一つのプローブ・シーケンスの中に2種類の色素を含んでいる。プローブのオリゴ塩基設計にあたっては、プライマの塩基配列と競合しない塩基配列を考えるだけでなく、融解温度( $T_m$ )も考慮する必要がある。しかも、ドナーとアクセプター色素の位置も蛍光強度の増加効率及びポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性に影響する。もう一つのゆらぎ分光法(蛍光クロスコリレーション分光法)が均一溶液中における特定目標遺伝子の検出法として報告されている(Castro, A. ら、Anal. Chem.、69、3915-3920、1997)。クロスコリレーション法では非常に低濃度の目標配列を検出出来るけれど、この方法は依然として、実験溶液中では2種類の蛍光プローブを必要とする。

【0057】

簡便性の観点からは、FCSに基づいたPCR定量法はエネルギー転移法およびクロスコリレーション法に比べて、重要な利点を有する。PCRの再現性と感度は、酵素のタイプ(Pol Iタイプ或いはタイプ)、プライマ配列、及び反応条件に強く依存する。一度これらの条件が決定されると、FCSに基づいたFA-PCRはプライマ比をわずかに変えるだけで、通常のPCRアッセイにすぐに応用出来る。それ故、ルーチンのPCR条件はFA-PCRの条件に容易に変更出来る。しかも、RT-PCR(逆転写PCR)のような他の増幅方法も、この方法に変更することが出来、将来的には一個の細胞中のmRNAを定量することも出来る。

【0058】

ゲル電気泳動及びカラムクロマトグラフィーではPCR産物はプライマと副産物から分離される。しかしながら、目標産物は電気泳動とゲル物質からの抽出課程で希釈され、さらにヌクレアーゼと接触する機会もあり、変成することもある。逆にFCSでは測定後のサンプル回収に便利であり、それはサンプル液滴はカバーガラスの上に置くだけであり、FCSは非侵襲性であるため、PCR溶液は



稀釈されることがなく、測定中に変成することもない。ゲル電気泳動の分解能は高く、1塩基の長さの違いを検出出来るが通常1時間程度の泳動時間を要するのに対して、FCSは非常な高速測定であり（実施例では1分間であるが、FCS装置の設計に応じて、適宜、それ1分より長くてもよく、好ましくは1分未満であってもよい）、例えば臨床検査やスクリーニング検査のような大量検体検査では利点がある。FCS検査後のサンプルは直ちにゲル電気泳動等で詳細に解析出来、FCS測定結果を確認したり、塩基配列を解析したり出来る。かつまた、回収されたサンプルは後に続く実験に使用することが出来る。たとえば、ハイブリダイゼーションプローブとして用いることが出来る。もしも、FCS測定後に増幅サンプルを回収する必要がなければ、キャリーオーバーによる汚染の危険性もなく廃棄出来る。というのは、FCSは非接触型の測定法だからである。

【0059】

FCSは非侵襲性であり、直接測定を可能にするので、PCRサンプル量はFCSが必要とする測定量で決まる。発明者による今回の測定は $10\mu\text{L}$ のサンプル量で行ったが、理論的には $10^{-15}\text{L}$ の体積要素レベルまで減らすことが出来る。しかし、PCR量は $1\mu\text{L}$ まで減らすことが出来れば、他の方法と比べて、経済面で大きな利点と言える。かつまた、FCSは蛍光顕微鏡を基礎としており、検出領域を対物レンズ上におくことが出来るため、*in-situ* PCRによる特定のRNAやDNAの定量に用いることが出来る。

【0060】

発明者は、PCR溶液の解析に2成分モデルを使用して、良好な結果を得た。しかし、他の実験では多くのDNA種が存在するかもしれない。そのような場合には、DNAの種は従来のゲル電気泳動法で良く分離出来る。観測されたFCSデータのモデル関数からの相関曲線の違いから溶液中に分布する他の成分の存在が示唆することが出来るが、単純な2成分モデルはそのような場合は限界があると思われる。その結果、もっと詳細な定量解析が必要とされる場合は、CONTIVN (Max-Planck Institute 製) のようなコンピュータプログラムを上述した本発明の方法に沿うように若干改訂するようにして、分布関数を得る多成分FCS解析法を開発するのが好ましい。

【0061】

本発明における測定工程は、物理的分離手段を用いることもなく、非侵襲的且つ非接触的に測定でき、使用するサンプル量も少ない。比較的少ないPCRサイクル数で測定する場合のように、標的核酸分子の初期量が明らかに少ないような測定条件で分析する場合には、測定工程に先だって、増幅過程で取り込まれなかった標識分子をゲルろ過等の適宜のBound/Free分離手段によって除去してから、上記非侵襲的且つ非接触的な測定を実行すれば、容易にS/N比を高めて感度上昇できるという有利な一面も有する。このような少量のサンプルの物理的取り扱いには毛細管を使用したり、薄いカバーガラスや、フィルムをかぶせたガラス表面上の小さな穴を用いて行うことが出来、リアルタイム解析に用いることも出来る。これらの特性とさらなる改良により、増幅課程のモニターは容易に（リアルタイムモニタリング）、自動検出システム（ロボティックス）も可能であることは明白である。我々はFCSに基づいたFA-PCR定量法は感度、定量精度、簡便性において利点を有すると結論する。この方法は迅速スクリーニングのみならず、分子診断の新時代を開くものと期待している。

【0062】

【発明の効果】

本発明によれば、基質分子に標識分子を標識してPCRによる増幅反応を行うとともに、標識分子の動き易さを測定するようにしたので、試料中の標的核酸の存在量を簡単な構成で正確に定量的に検出できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明の方法を実施するための装置の一例を示す概略図。

【図2】

図2は、図1の装置の一部拡大図。

【図3】

図3は、アガロース電気泳動における増幅産物4kbの特性を示す写真。

【図4】

図4は、PCRにおける、Fluorescenceの%比の関数として得た、標識濃

度と産物量の関係を示すグラフ。

【図 5】

図 5 は、PCR 反応の過程における自己相関関数の推移を示すグラフ。

【図 6】

図 6 は、各自己相関関数をゼロ時間遅れのところで規格化したグラフ。

【図 7】

図 7 は、PCR サイクル数の関数として PCR 反応溶液中 ( $5\mu\text{l}$ ) における増幅 DNA 分子数を示すグラフ。

【図 8】

図 8 は、鋳型の初期数の関数としての 20 サイクル後の DNA 分子数を示したグラフ。

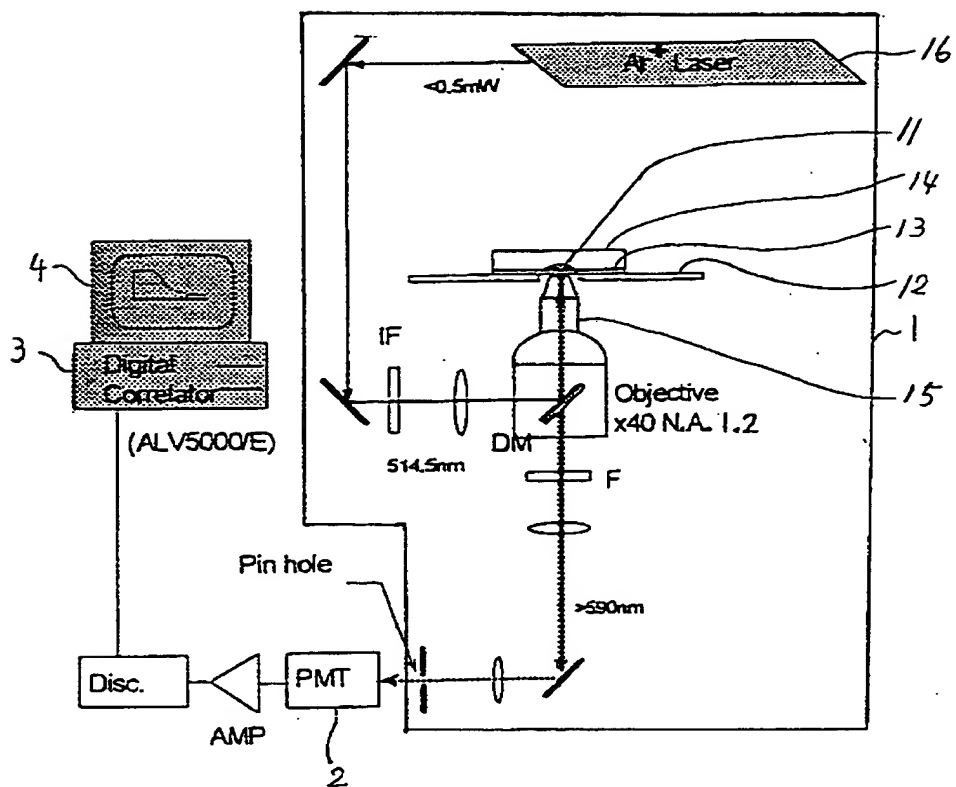
【符号の説明】

- 1 … 蛍光顕微鏡、
- 2 … フォトマルチプライヤ、
- 3 … データ処理装置、
- 4 … 表示装置、
- 11 … 試料含有液、
- 12 … 試料台、
- 13 … スライドガラス、
- 14 … 蓋、
- 15 … 対物レンズ、
- 16 … レーザー発生装置。

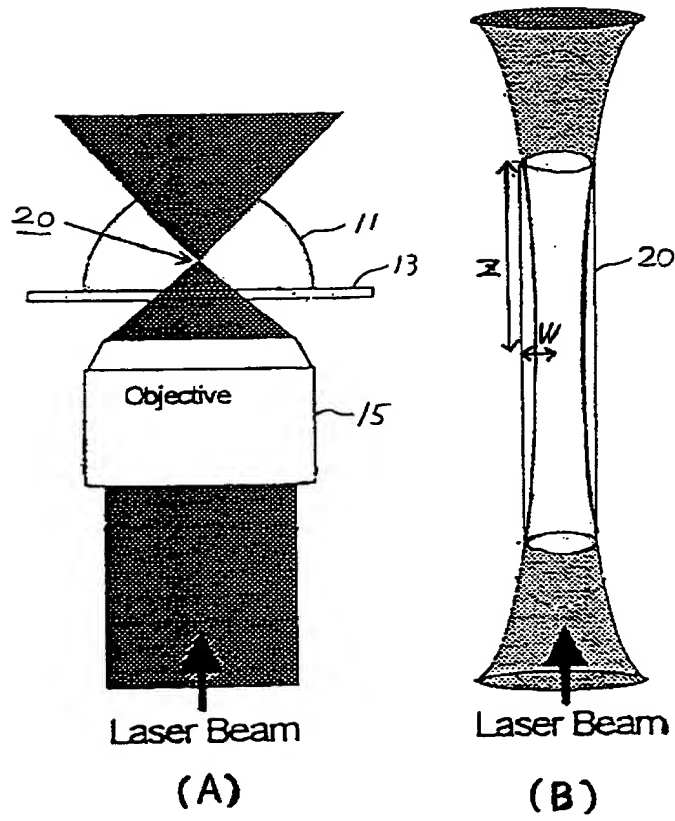
【書類名】

図面

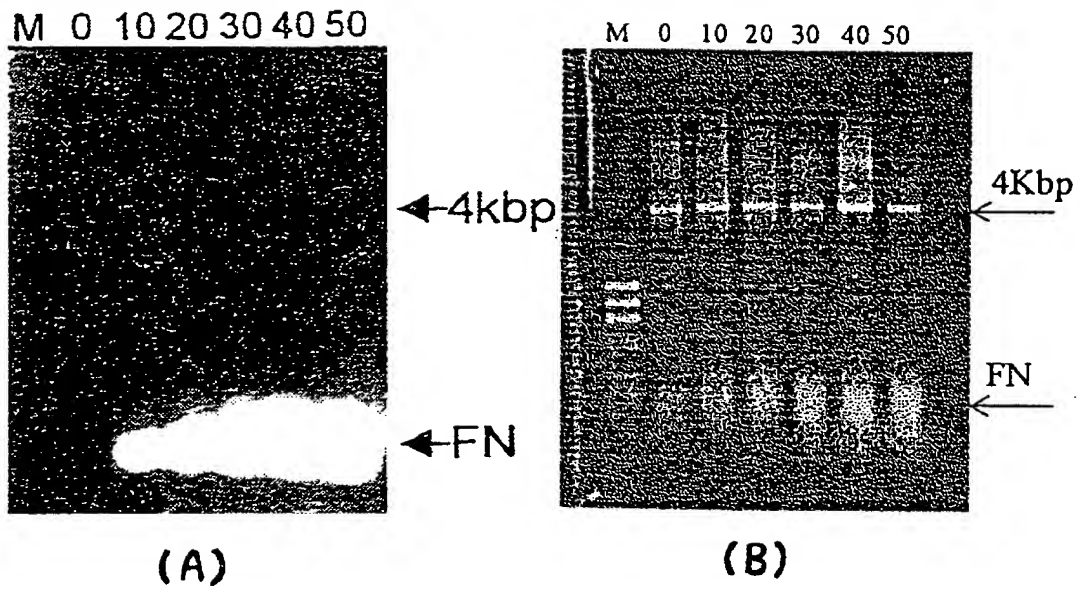
【図 1】



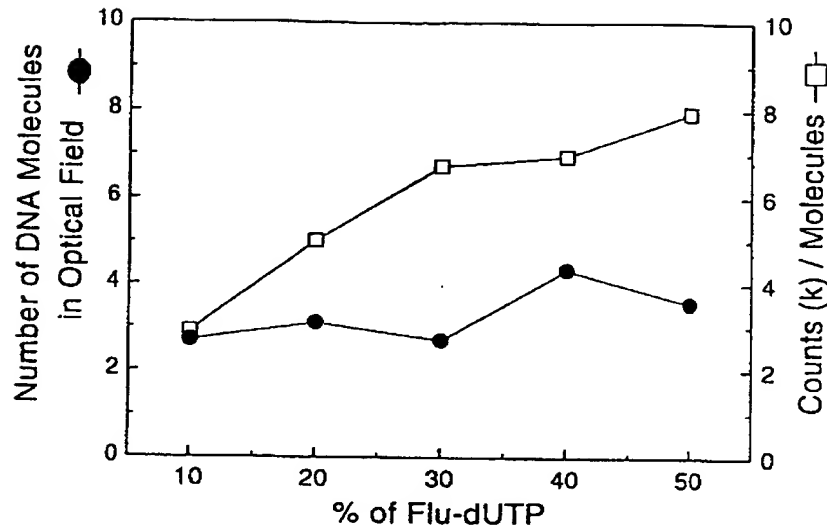
【図 2】



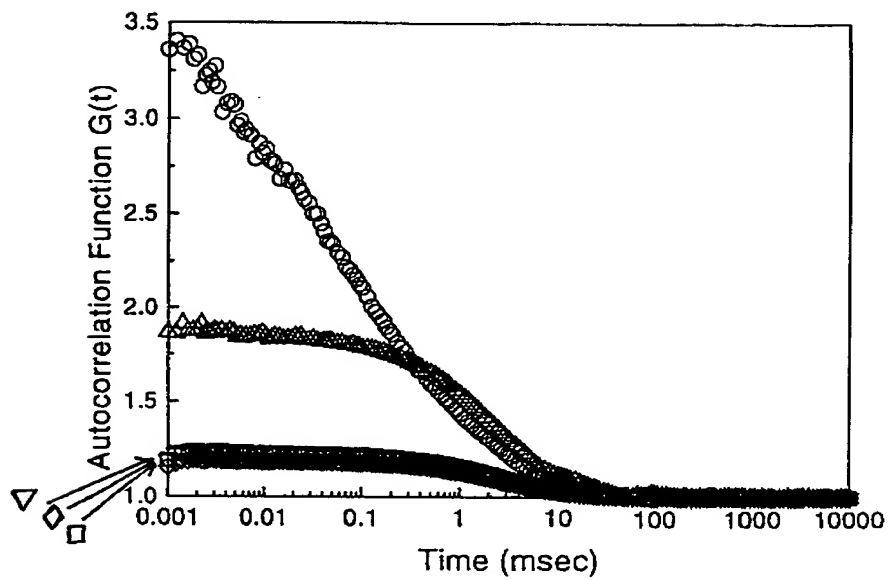
【図 3】



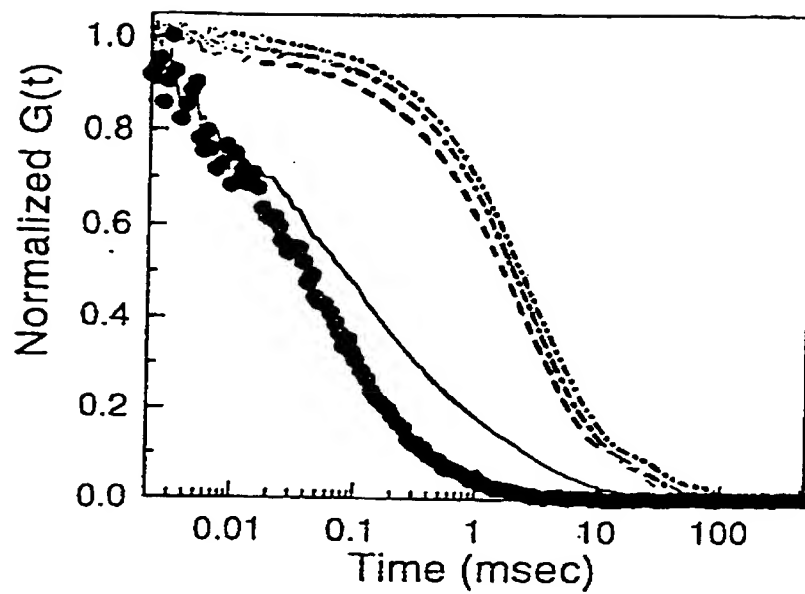
【図 4】



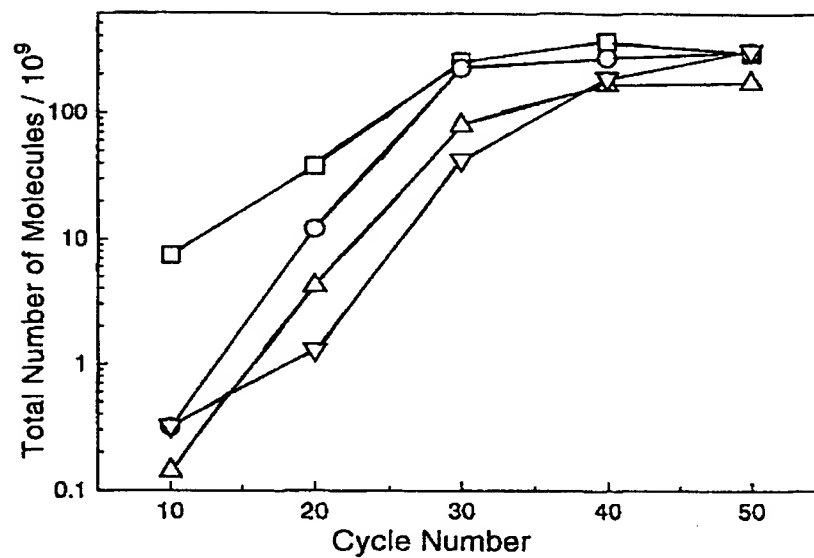
【図 5】



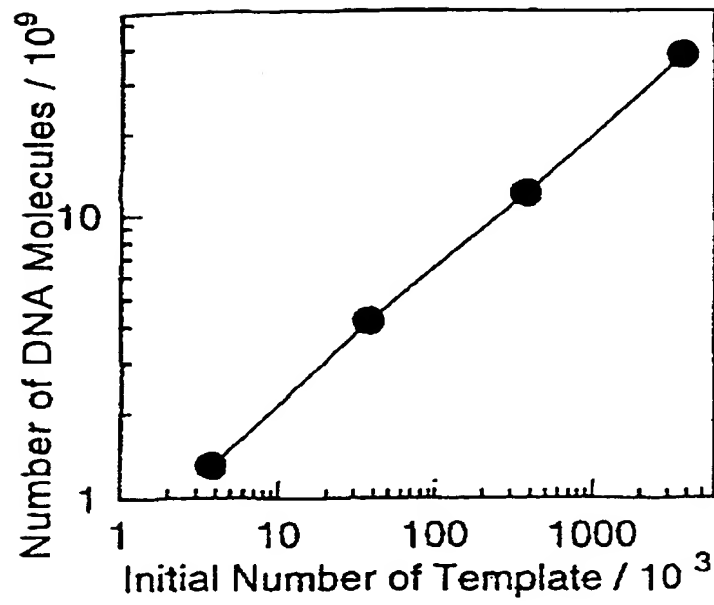
【図 6】



【図 7】



【図 8】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡単な構成で定量性の高い標的核酸の分析方法および装置を提供する。

【解決手段】 標的核酸を含有する生物試料を、プライマと、蛍光標識された基質と、DNAポリメラーゼとともに混合して検液とし、所定の核酸増幅反応を実行した後に、この検液をスライドガラス 1 3 上に点着して、倒立型の蛍光顕微鏡 1 の試料台 1 2 に載せる。フォトマルチプライヤ 2 が測定したデータは、データ処理装置 3 において自己相関関数による演算を行い、その演算結果に基づいて標的核酸に関する数値化またはグラフ化された定量情報を表示装置 4 の画面上に表示する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598168151]

1. 変更年月日 1998年12月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市北区北23条西13丁目南新川宿舍10-404

氏 名 金城 政孝